

Analyse cytophotométrique comparée des parois de mésophylle de feuilles de *Sequoiadendron giganteum* jeunes et âgés (*)

par Olivier MONTEUUIS ^{1,2} et Simonne GENESTIER²

¹Association Forêt Cellulose, Domaine de l'Etançon, F-77370 Nangis

²Laboratoire de Phytomorphogenèse, Université de Clermont II,
4 rue Ledru, F-63038 Clermont-Ferrand Cedex

Résumé. - Une technique d'analyse histochimique de composés pariétaux par cytophotométrie a été appliquée à des coupes transversales de feuilles de séquoias géants (*Sequoiadendron giganteum*) jeunes et âgés. Les parois du mésophylle du matériel âgé contiennent plus de polysaccharides que celles du matériel jeune. Cette tendance, qui persiste après l'hydrolyse des substances pectiques, puis des hémicelluloses, et enfin des autres polysaccharides non cellulotiques, serait due, du moins en partie, à des teneurs plus élevées en hémicellulose et en cellulose.

Summary. - A histochemical technique to investigate cytophotometrically cell wall components was applied to transverse sections of leaves belonging to young and mature giant sequoias (*Sequoiadendron giganteum*). Mesophyll cell walls of mature material contained more polysaccharides than the young material ones. This tendency which remained unchanged after the hydrolysis of the pectic substances, then the hemicelluloses and finally the other non cellulotic polysaccharides, could be partly due to higher hemicellulose and cellulose concentrations in the mature material.

Key words : cell wall components - cytophotometric analysis - mesophyll - polysaccharides - young and mature *Sequoiadendron giganteum*.

*

* *

INTRODUCTION

Le vieillissement des végétaux ligneux au cours de leur développement est lié à une modification de certaines caractéristiques des formes juvéniles, résumées notamment par Franclet (1983). Cette revue de synthèse fait abondamment référence à plusieurs aspects de la biologie végétale affectés par le phénomène, mais révèle un manque d'informations du point de vue histologique.

Sur notre matériel d'étude, *Sequoiadendron giganteum*, le dimorphisme foliaire marqué en fonction de l'âge (Monteuuis, 1985) nous a incités à

(*) Manuscrit reçu le 8 avril 1988 ; accepté le 10 février 1989

compléter nos observations morphologiques par des analyses infrastructurales. En nous inspirant d'études histochimiques antérieures (Jensen, 1962 ; Jona et Foa, 1977), nous avons cherché à apprécier par cytophotométrie les effets comparés de divers traitements hydrolytiques sur les parois du mésophylle des feuilles de séquoias géants jeunes et âgés.

MATERIEL ET METHODES

Origine des échantillons

Les échantillons ont été récoltés dans les mêmes conditions sur des pieds-mères clonés obtenus 3 ans auparavant, en distinguant un clone jeune issu du bouturage d'un semis de séquoia géant de 18 mois, d'un clone âgé provenant d'un séquoia géant centenaire greffé (Monteuuis, 1985). Ce matériel, au port bas et diffus entretenu par des prélèvements fréquents, est cultivé à l'extérieur à l'Université de Clermont-Ferrand. Les feuilles analysées sont prélevées dans la partie médiane de la pousse de l'année, durant le repos hivernal des pieds-mères.

Préparation des échantillons

Les feuilles récoltées sont fixées dans un mélange : éthanol 95 %, formaldéhyde 40 %, acide acétique glacial (17/2/1 ; v/v/v), puis déshydratées avant inclusion dans la paraffine (Jensen, 1962). La partie libre de chaque feuille en alène (Monteuuis, 1985) est débitée transversalement au microtome en sections de 10 μ m d'épaisseur, réparties ensuite équitablement sur 4 lames porte-objet pour constituer un lot (Jensen, 1960 et 1962). Chaque lot de matériel âgé est systématiquement apparié à un lot de matériel jeune pour être soumis, après déparaffinage, à la succession de traitements hydrolytiques détaillés ci-après, en conservant à l'issue de chaque étape une lame pour analyse (Jensen, 1962) : A - aucun traitement témoin ; B - immersion durant 12 heures à 30°C dans une solution aqueuse de pectinases (EC 3.2.1.15., Sigma) à 7000 unités/l, puis trempage pendant 2 heures à 90°C dans une solution à 0,5 % d'oxalate d'ammonium ; C - trempage durant 12 heures à température ambiante dans une solution à 4 % de NaOH ; D - trempage durant 12 heures à température ambiante dans une solution à 17,5 % de NaOH.

Ces différentes étapes sont destinées à éliminer successivement et respectivement les substances pectiques (B), les hémicelluloses (C) et les autres polysaccharides non cellulosiques pour ne conserver théoriquement que la cellulose (D) (Jensen, 1960 ; Jona et Foa, 1977). Après chaque traitement, les lames sont rincées abondamment et avec précaution dans de l'eau distillée. Le décollement des coupes, véritable handicap, a été limité par un film d'éthyle cellulose (Sigma) - 0,5 % dans un mélange de toluène/alcool absolu (4/1 ; v/v) qui doit être renouvelé à chaque traitement chimique (Jona et Foa, 1977 ; Jona et coll., 1981). A l'issue de ces hydrolyses, les lots de matériel âgé et de matériel jeune appariés sont colorés au P.A.S. (acide périodique-Schiff) conformément à la procédure préconisée par Jensen (1962).

Mesures, expression et traitements des données

Les effets des différents traitements hydrolytiques ont été analysés quantitativement au niveau des parois du mésophylle à l'aide d'un cytophotomètre Reichert. La surface effective photométrée à travers les parois de 1,2 μ m d'épaisseur moyenne correspond à un disque de 1 μ m de diamètre. L'intensité de la coloration, proportionnelle à la teneur en polysaccharides, est indiquée par la transmission T (Jona et Foa, 1977 ; Jona et coll., 1981) mesurée au moyen d'un photomultiplicateur pour la longueur d'onde de 560 nm, valeur retenue après établissement de la courbe d'extinction (Lison, 1960). Les résultats analysés sont exprimés en densité optique (D.O.) définie par la relation : $D.O. = -\log T$ (Lison, 1960), et correspondant aux moyennes établies à partir des 30 mesures par coupe pour chacune des 4 lames des lots. Le test statistique de Wilcoxon (Snedecor et Cochran, 1957) a été appliqué pour comparer les échantillons du clone jeune à ceux du clone âgé, au sein des lots constamment appariés au cours des différentes séquences d'hydrolyses, puis de coloration au P.S.A. Les comparaisons 2 à 2 ont été effectuées sur 10 à 18 paires de coupes par variante de traitement.

RESULTATS

Une analyse de variance appliquée à l'ensemble des lots traités pour chacun des 2 clones indique un effet significatif ($p < 0,001$) des différents traitements hydrolytiques sur les valeurs mesurées par cytophotométrie, et ce, malgré une variabilité intra-classe certaine, exprimée par l'amplitude des intervalles de confiance ($p = 5 \%$) de la figure.

Les comparaisons inter-clonales réalisées à partir des échantillons

appariés traduisent une teneur pariétale en polysaccharides totaux plus élevée dans le mésophylle des feuilles du matériel âgé que dans celui du matériel jeune ($0,001 < p < 0,005$). Cette tendance persiste après l'hydrolyse des substances pectiques ($0,001 < p < 0,005$), puis des hémicelluloses ($0,001 < p < 0,005$), et enfin des autres polysaccharides non celluloses ($0,01 < p < 0,025$). Pour chacun des 2 clones, les moyennes correspondant à l'ensemble des lots analysés par variante de traitement sont illustrées dans la figure 1.

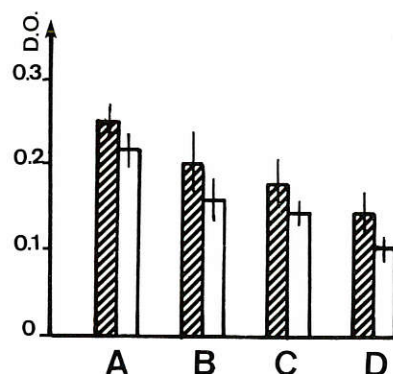


Fig. 1.- Moyennes des résultats cytophotométriques - en densité optique D.O. - par variante de traitement et par clone, de l'ensemble des lots appariés comparés ; les intervalles de confiance sont représentés pour $p = 5\%$.

A : aucune hydrolyse (témoin) ; B : après hydrolyse des substances pectiques ; C : après hydrolyse des substances pectiques et des hémicelluloses ; D : après hydrolyse des substances pectiques, des hémicelluloses et des autres polysaccharides non celluloses. □ clone jeune. ▨ clone âgé.

Fig. 1.- Extinction value averages according to the different experimental treatments and to the clone. Vertical bars represent confidence intervals ($p = 5\%$).

A : control ; B : after removal of pectic substances ; C : after removal of pectic substances and hemicelluloses ; D : after removal of pectic substances, hemicelluloses and other non cellulosic polysaccharides. □ young clone. ▨ mature clone.

L'analyse comparative inter-clonale, en considérant individuellement chaque catégorie de composés pariétaux d'après leur nature (composés pectiques, hémicelluloses, autres polysaccharides non celluloses et finalement la cellulose - Jensen, 1960 et 1962 ; Jonas et coll., 1981), n'indique pas de différence significative, hormis pour les hémicelluloses et la cellulose, plus abondantes dans le vieux matériel (respectivement $0,025 < p < 0,05$ et $0,01 < p < 0,025$).

DISCUSSION

La technique d'histochimie associée aux mesures cytophotométriques présentée permet de comparer des structures microscopiques visualisées bien précises avec une bonne sensibilité. Certains aspects méritent néanmoins d'être commentés. La réelle efficacité des différents traitements hydrolytiques spécifiques est difficilement contrôlable. En effet, il est permis de supposer que les hydrolyses des divers composés pariétaux envisagés ne sont pas totales (Roland, 1980 ; Tollier et Riquet, 1980), bien que les traitements décrits, surtout chimiques, soient suffisamment violents pour altérer l'intégrité structurale des coupes et favoriser leur décollement des lames porte-objet, en dépit du film protecteur d'éthyle cellulose, conformément aux remarques d'autres auteurs (Jensen, 1960 et 1962 ; Jona et Foa, 1977 ; Jona et coll., 1981).

La mise en évidence, au niveau du mésophylle de feuilles de séquoias géants, d'une concentration en polysaccharides pariétaux d'autant plus élevée que le sujet est âgé, est un résultat nouveau qui n'en demeure pas moins cohérent. Les différences observées, notamment du point de vue des hémicelluloses et celluloses (voir Jensen, 1960 ; Joseleau, 1980 ; Lorences et coll., 1987a et b), pourraient s'instaurer au cours des processus de différenciation pariétale (Catesson, 1980 ; Gross, 1984) associés au développement des feuilles qui, chez *Sequoiadendron*

giganteum, présentent des dissemblances morphologiques très contrastées en fonction de l'âge des individus (Monteuuis, 1985).

Des analyses similaires connexes, mais quantitativement plus restreintes, effectuées au niveau des parois du parenchyme sous-jacent aux méristèmes apicaux caulinaires, incitent à penser que ces différences de composition pariétale entre jeunes et vieux sujets surviennent précocement au cours de l'édification des structures végétatives aériennes (Lorenaces et Zarra, 1986 ; Lorenaces et coll., 1987a et b). Il serait intéressant de poursuivre ces comparaisons au niveau de la chronologie phyllogénique (initium, primordium, ébauche foliaire, jeunes feuilles ...), en considérant également d'autres tissus. Dans le cas présenté de feuilles adultes, seul le mésophylle a répondu favorablement à la technique d'histochimie appliquée, comme nous avons pu le vérifier par les analyses de variance. Les tentatives d'analyses effectuées sur d'autres tissus nous ont amenés à des résultats incohérents, notamment au niveau de l'assise de cellules sous-épidermiques qui possèdent des parois bien plus développées dans le matériel âgé que dans le matériel jeune ($240 \mu\text{m}^2$ contre $152 \mu\text{m}^2$ de section moyenne par coupe cellulaire). Ces déboires pourraient s'expliquer par l'existence d'une matrice de lignines (Jensen, 1960 et 1962 ; Monties, 1980) - composés également réactifs au P.A.S. (Jensen, 1962) - intimement associée aux polysaccharides pariétaux (Jensen, 1962 ; Catesson, 1980 ; Roland, 1980 ; Donaldson, 1985).

CONCLUSION

La technique d'analyse cytophotométrique appliquée au mésophylle de feuilles de *Sequoiadendron giganteum* a permis de mettre en évidence des différences significatives de composition en polysaccharides pariétaux entre jeunes et vieux individus. Ce résultat original mériterait d'être vérifié sur d'autres espèces, et approfondi dans le cadre de l'étude des phénomènes liés au vieillissement des végétaux au cours de leur développement ontogénique.

Remerciements .- Les auteurs tiennent à remercier le Dr. Maryse Tort de l'Université de Clermont II pour ses précieuses informations, ainsi que le Pr. Roberto Jona de l'Université de Turin (Italie) pour ses encouragements.

BIBLIOGRAPHIE

- CATESSON A.M., 1980.- Les tissus végétaux. In : Les polymères végétaux. Gauthier-Villars, éd., Paris, 1-29.
 DONALDSON L.A., 1985.- Critical assessment of interference microscopy as a technique for measuring lignin distribution in cell walls. New Zealand J. Forestry Sci., 15 (3), 349-360.
 FRANCIET A., 1983.- Rajeunissement : théorie et expériences pratiques clonales. Clonal Forestry Proc., XIXth meeting, part 2, 96-134.
 GROSS K.C., 1984.- Fractionation and partial characterization of cell walls from normal and non-ripening mutant tomato fruit. Physiol. Plant., 62, 25-32.
 JENSEN W.A., 1960.- The composition of the developing primary cell wall in onion root tip cells. II - Cytochemical localization. Am. J. Bot., 47, 287-295.
 JENSEN W.A., 1962.- Botanical histochemistry. Freeman and Co., éd., San Francisco et Londres, 408p.
 JONA R. et FOA E., 1977.- Histochemical determination of polysaccharides in fruit pulp cell walls. Cytologia, 42, 495-500.
 JONA R., E. ACCATI et S. MAYAK, 1981.- Senescence processes as reflected in change in polysaccharidic cell wall components. Acta Horticulturae, 113, 153-158.
 JOSELEAU J.P., 1980.- Les hémicelluloses. In : Les Polymères végétaux. Gauthier-Villars, éd., Paris, 87-121.
 LISON L., 1960.- Histochimie et cytologie animales. Tome 1, Gauthier-Villars, éd., Paris, 397p.
 LORENACES E.P. et I. ZARRA, 1986.- Hypocotyl growth of *Pinus pinaster* seedlings. Changes in osmotic potential and cell wall composition. Physiol. Plant., 67, 377-382.

- LORENCES E.P., L. SUAREZ et I. ZARRA, 1987a.- Hypocotyl growth of *Pinus pinaster* seedlings. Change in α cellulose and in pectic and hemicellulosic polysaccharides. *Physiol. Plant.*, 69, 461-465.
- LORENCES E.P., L. SUAREZ et I. ZARRA, 1987b.- Hypocotyl growth of *Pinus pinaster* seedlings. Changes in the molecular weight distribution of hemicellulosic polysaccharides. *Physiol. Plant.*, 69, 466-471.
- MONTEUUIS O., 1985.- La multiplication végétative du séquoia géant en vue du clonage. *Ann. AFOCEL* 1984, 139-171.
- MONTIES B., 1980.- Les lignines. *In* : Les polymères végétaux. Gauthier-Villars, éd., Paris, 30-45.
- ROLAND J.C., 1980.- Visualisation des polysaccharides au niveau structural. *In* : Les polymères végétaux. Gauthier-Villars, éd., Paris, 30-45.
- SNEDECOR G.W. et W.G. COCHRAN, 1957.- Méthodes statistiques. Acta, éd., Paris, 669p.
- TOLLIER M.Th. et A.M. RIQUET, 1980.- Dosage des polyosides. *In* : Les polymères végétaux. Gauthier-Villars, éd., Paris, 156-175.